

小腸粘膜増殖能の加齢に伴う変化と前初期遺伝子 *c-fos*, *c-jun* の発現に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科 外科学第二講座 (主任: 三輪晃一教授)

根 塚 秀 昭

小腸粘膜上皮細胞の加齢に伴う増殖能の変化を解明するため、幼少ならびに成熟ラットの小腸における、絶食解除後の組織形態、前初期遺伝子群の一種である核内転写因子 *c-fos* と *c-jun* の mRNA と蛋白の発現、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) を用いた細胞増殖活性の時間的推移を検討した。組織形態的に、幼少群の絨毛伸長は絶食解除後48時間で非絶食群の絨毛高に回復したのに対し、成熟群の絨毛伸長は緩慢で、絨毛高の回復に96時間を要した。*c-fos*, *c-jun* mRNA 発現量は、幼少群では絶食解除後2時間から72時間まで増加し、絶食解除後2時間で非絶食群に比較し *c-fos* は最高3.1倍、24時間で *c-jun* は最高2.8倍に増加したのに対し、成熟群では *c-fos*, *c-jun* ともに有意な増加を認めなかった。また、免疫組織化学染色では、幼少群の絶食解除後の粘膜増殖帯と吸収上皮で *c-Fos*, *c-Jun* 蛋白が陽性に染色されたのに対し、成熟群では増殖帯のみに1腺管当たり2~7個の陽性細胞がみられるにすぎなかった。PCNA標識率でみた細胞増殖活性は、幼少群では絶食解除直後より上昇を認め、絶食解除後2時間をピークに48時間まで成熟群に比較して有意に高い増殖活性を認めたのに対し、成熟群では絶食解除後72時間まで有意の上昇を認めなかった。以上より、転写因子 *c-fos* と *c-jun* の活性化が、小腸粘膜絨毛の増殖活性に関与し、加齢による *c-fos* と *c-jun* の活性化の欠如が成熟群での増殖能の低下に関連していることが明らかにされた。

Key words *c-fos*, *c-jun*, refeeding, aging, growth of the small intestinal epithelium.

生体内の各臓器は、外因に対する適応力を有しており、低栄養、損傷、ショック時における虚血等の侵襲に対して、その後の増殖や肥大等による代償反応が生じる。小腸では、絶食、切除、ショック時における虚血等の侵襲に対する一連の代償反応として、粘膜絨毛の脱落・短縮と、その後の増殖再生が生じることが知られている^{1)~4)}。小腸広範切除後の残存小腸では、粘膜絨毛の増殖による代償反応が生じるが、高齢者の代償能は小児に比較して充分ではなく^{5)~10)}、その差に関わる機序は不明な点が多い。

小腸広範切除後の栄養障害の治療として、長期に経静脈栄養を行うことによる種々の副作用のため、欧米ではすでに小腸移植による治療が増加している¹¹⁾¹²⁾。移植小腸の増殖能は、ドナーの年齢により異なり、移植後の小腸機能に影響を与えるため、ドナーの選択時には、組織適合性の判定とともに増殖能の予測が必要である^{12)~14)}。したがって、加齢による増殖能の変化の機序を解明することは、移植小腸の術後の機能を推測する手段の一助につながり、意義あることと考えられる。

一方、核内転写因子である *c-fos*, *c-jun* は、前初期遺伝子の一種で、DNA結合蛋白であるアクチベータープロテイン-1 (activator protein-1, AP-1) を構成し、種々の遺伝子の発現を制

御している。生体外では一般に EGF, TGF- α , TGF- β , FGF, PDGF 等の増殖因子、熱ショック、放射線照射、紫外線照射等に応答して、その転写が活性化されることが報告されている¹⁵⁾。小腸における粘膜上皮細胞の増殖には、上皮細胞内の内因性遺伝子の活性化が必要であり、この *c-fos*, *c-jun* 遺伝子が小腸上皮細胞の増殖と分化に関与していることが明らかにされている¹²⁾。したがって、*c-fos*, *c-jun* 遺伝子の発現を検討することは、腸管粘膜の増殖能を知ることにつながると考えられる。そこで、小腸粘膜上皮細胞の加齢に伴う増殖能の変化に関する機序を解明する目的で、週齢の異なる幼少ならびに成熟ラットの小腸を用い、絶食解除後の細胞増殖能を *c-fos*, *c-jun* 遺伝子発現の観点から検討した。

材料および方法

I. 実験モデルの作成

実験材料には、幼少群として、哺乳期を過ぎ固形食の摂取を始める5週齢の雄性ルイスラット (体重100g前後)、成熟群として、生存率が下がり始める60週齢 (体重500g前後) の雄性ルイスラットを用いた。幼少群、成熟群ともに72時間の絶食後、標準配合飼料 CRF-1 (Charles River Japan Laboratories, 東京)

平成10年12月21日受付, 平成11年2月12日受理

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RT, reverse transcription; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine-5'-triphosphate-biotin nick end-labeling

の自由摂取による再摂食を開始させ、絶食解除後0時間(72時間絶食直後)、2時間、24時間、48時間、72時間で犠牲死させた。対照群は、幼少群、成熟群ともに絶食前のラット(非絶食群)とした。各群それぞれ30匹ずつ作成し、各時間ごとに5匹ずつ犠牲死させ組織を採取した。

空腸の採取は、40mg/kgのペントバルビタール(pentobarbital)の腹腔内投与による全身麻酔下に開腹し、トライツ靱帯より回腸末端部までの全小腸を4等分し、口側より2分目の1/4長の空腸を採取し、その口側3cmをHE染色による組織学的観察と、*c-fos*、*c-jun*モノクローナル抗体ならびに増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)による免疫組織化学染色による観察用に、残りをmRNA測定用に使用した。

II. 粘膜組織形態の観察

小腸粘膜組織形態の観察には、病理組織学的検索用の小腸を10%ホルマリンで固定後、腸管に長軸の切片を作成し、薄切後HE染色し、マイクロメーターにて小腸粘膜絨毛高と小腸陰窩深を測定した。結果は、1検体につき10腺管以上計測し、その平均値で表した。

III. 小腸粘膜のmRNAの測定

各実験動物の小腸粘膜からRNAを抽出した後、逆転写反応により作成したcDNAの段階希釈系列を作成し、PCRを施行した。アガロースゲル電気泳動後、各PCR産物を臭化エチジウム(ethidium bromide)染色により解析した。また、それぞれの増幅DNA断片の塩基配列に特異的なプローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法により、増幅DNA断片の解析を行った。増幅DNA量は、それぞれの放射活性値を、非絶食群の放射活性値で補正した相対的な値として表し、さらに*c-fos*、*c-jun*のmRNA発現量は、それぞれの相対的DNA量を個々のラットグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, G3PDH)の相対的増幅DNA断片量で補正した値として表した。以下に各操作の詳細を示す。

1. 全RNAの抽出

RNAの抽出にはISOGEN(ニッポンジーン、富山)を用いた。空腸を採取後、直ちに粘膜をメスで細切し、4℃、1mlのISOGENを入れたホモジナイザー用ガラス容器に移し、ホモジナイザーで破碎、懸濁させ、3分間放置し、4℃で12,000回転/分で15分間遠心した。上清を採取し、0.5mlのイソプロピルアルコールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で12,000回転/分で10分間遠心した。上清を除去した後、1mlの75%エタノールを加え攪拌後、4℃で7,500回転/分で5分間遠心し、再び上清を除去し10分間減圧乾燥した後、滅菌蒸留水に溶解した。各RNAの260nmにおける吸光度を測定し、1ODを40μg/mlとしてRNA濃度を計算した。

2. プライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドの作成

367塩基対のラット*c-fos*遺伝子cDNAを特異的に増幅するPCRプライマーとしてセンスプライマー(687-706) 5'-GTAGAGCAGCTATCTCCTGA-3'とアンチセンスプライマー(1162-1180) 5'-TCCACATCTGGCAGAGC-3'、プローブとして

5'-GGGGGTCTGCCTGAGGCTACCACCCC-3'(975-1000)をラット*c-fos*遺伝子cDNAの塩基配列より決定した。496塩基対のラット*c-jun*遺伝子cDNAを特異的に増幅するPCRプライマーとしてセンスプライマー(542-561) 5'-AACGACCTTCTACGACGATG-3'とアンチセンスプライマー(887-906) 5'-GCAGCGTATTCTGGCTATGC-3'、プローブとして5'-GCCGCACCTCCGAGCCGAAGTCCG-3'(674-699)をラット*c-jun*遺伝子cDNAの塩基配列より決定した。また984塩基対のG3PDH遺伝子cDNAを特異的に増幅するPCRプライマーとしてセンスプライマー(35-57) 5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTT-3'とアンチセンスプライマー(995-1016) 5'-ATCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG-3'、および、プローブとして5'-ATCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG-3'(514-538)をラットG3PDH遺伝子cDNAの塩基配列より決定した。プローブDNA 10pmolに対し[γ-³²P] ATP (Amersham, Greenwich, USA) 10μCi、ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液[終濃度50mM Tris-HCl (pH 7.6), 10mM MgCl₂, 5mM ジチオスレイトール(dithiothreitol, DTT), 10mM 塩酸スぺルミジン(spermidine-HCl), 1mM EDTA], 10単位T4キナーゼ(和光、大阪)および滅菌蒸留水を加え全量を6μlとし、37℃で45分間保温することで5'末端を標識した後、ハイブリダイゼーションに用いた。

3. 逆転写反応

RNA試料4μgにオリゴdTプライマー[oligo(dT) 16primer](perkin Elmer Cetus, Norwalk, CA) 1μgを加え蒸留水で全量を33μlとし、68℃で15分間加熱後、水中にて急冷した。これに逆転写(reverse transcription, RT)反応緩衝液[終濃度50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT], デオキシリボヌクレオチド混合液(dATP, dCTP, dGTP, dTTP各0.5mM), RNA分解酵素阻害因子(ribonuclease inhibitor) RNasin (Promega Biotec, Madison, USA) 200単位および滅菌蒸留水を加え全量50μlとし、42℃で1時間保温してcDNAを合成した。さらに95℃にて5分間加熱した後、水中にて急冷した。各々のcDNA溶液50μlはRNA 4μgから合成されたものであるため、RNA 1μgから合成されたcDNA量に相当する溶液量は12.5μlとなる。またRNA 10⁻¹μg, 10⁻²μgに相当するcDNA溶液量はそれぞれ12.5×10⁻¹, 12.5×10⁻²μlに相当する。このためcDNA溶液の3段階10倍希釈系列(原液, 10倍希釈液, 10²倍希釈液)を作成し、それぞれ12.5μlずつをPCR反応に使用して、目的とするmRNAの定量化を行った。また*c-fos* mRNAおよび*c-jun* mRNA発現量の定量化に際し、G3PDHは内部コントロールとして使用した。

4. PCR反応

各々のcDNA溶液12.5μlにPCR反応緩衝液[終濃度10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01%ゼラチン(Sigma, St.Louis, USA), デオキシリボヌクレオチド混合液(dATP, dCTP, dGTP, dTTP各250μM)], センスおよびアンチセンスプライマー各50pmol, Taq DNAポリメラーゼ(perkin Elmer) 1単位および滅菌蒸留水を加え全量30μlに調整した。これに20μlのミネラルオイル(Sigma)を重層させ、サーマルサイクラー(PC700, アステック, 福岡)でPCR反応を行った。熱変性を94℃, 1分間, アニールを58℃, 2分間, DNAの伸長を72℃, 2分間とし、これを1サイクルとして25サイクル

施行した。

5. 増幅DNA断片の検出

PCR反応後のDNA溶液に滅菌蒸留水70 μ lとクロロホルム150 μ lを加えて振盪した後、水層を採取した。この溶液に10 μ lの3M酢酸ナトリウム (pH 5.2) と99%エタノールを300 μ l添加し、 -80°C で30分間放置した後、 4°C で15,000回転/分で20分間遠心しDNAを沈殿させた。このDNAを80%エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、試料溶解液 [0.06%ブロムフェノールブルー (bromophenol blue), 0.06%キシレンシアノール (xylene cyanol), 6.7%グリセロールを含むTris-EDTA緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)] 9 μ lに溶解した。各試料は0.5 μ g/mlの臭化エチジウムを含む泳動緩衝液 (40mM Tris, 20mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA, pH 8.0) 中で、定電圧100Vにて1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後のゲルは紫外線照射下に写真撮影を行った後、サザン法に準じてDNAの転写を行った。すなわち、泳動終了後のゲルをアルカリ変性液 (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) 中で30分間振盪しDNAを変性させた後、中和液 (3M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH 7.2) 中で15分間の振盪を2回繰り返した。DNAはSSC (saline-sodium citrate) (3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム) を用いてゲルからナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N+nylon membrane, Amersham) に転写した。転写後のフィルターに10分間紫外線を照射してDNAのフィルターへの固定を強固にした。フィルターをラピッドハイブリダイゼーションバッファー

(Rapid hybridization buffer, Amersham) を満たしたハイブリバック (コスモバイオ, 東京) 内に入れ、 42°C の恒温水槽内で15分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、 ^{32}P で標識したプローブを最終濃度が1pmol/mlとなるようにハイブリバック内へ投与し、 42°C の恒温水槽内で2時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のフィルターを 42°C のSSC (0.3M NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム), 0.1% SDS溶液 (sodium dodecyl sulfate) で15分間2回洗浄した後、バイオイメージアナライザー (富士フィルム, 東京) を用いて、PCR増幅DNA断片に相補的に結合したプローブの放射活性を測定し、DNA断片を定量化した。

IV. 免疫組織化学染色

c-fos および *c-jun* 遺伝子産物がそれぞれ小腸に実際に発現していることを、抗c-Fosモノクローナル抗体および抗c-Junモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色で確認した。また、小腸粘膜の細胞動態を解析するため、細胞周期のG₁後期からS期前半に存在する細胞増殖期関連核蛋白であるPCNAの標識率を検討した。

すなわち、採取した空腸の一部を、10%ホルマリン液で固定し、免疫組織化学染色に供した。パラフィン包埋固定標本より4 μ m切片を3個作製し、脱パラフィン後内因性ペルオキシダーゼを不活化するため0.3%過酸化水素水加メタノールに20分間浸透し、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) (phosphate-buffered saline, PBS) で洗浄した。次に非特異的抗原抗体反応を防止す

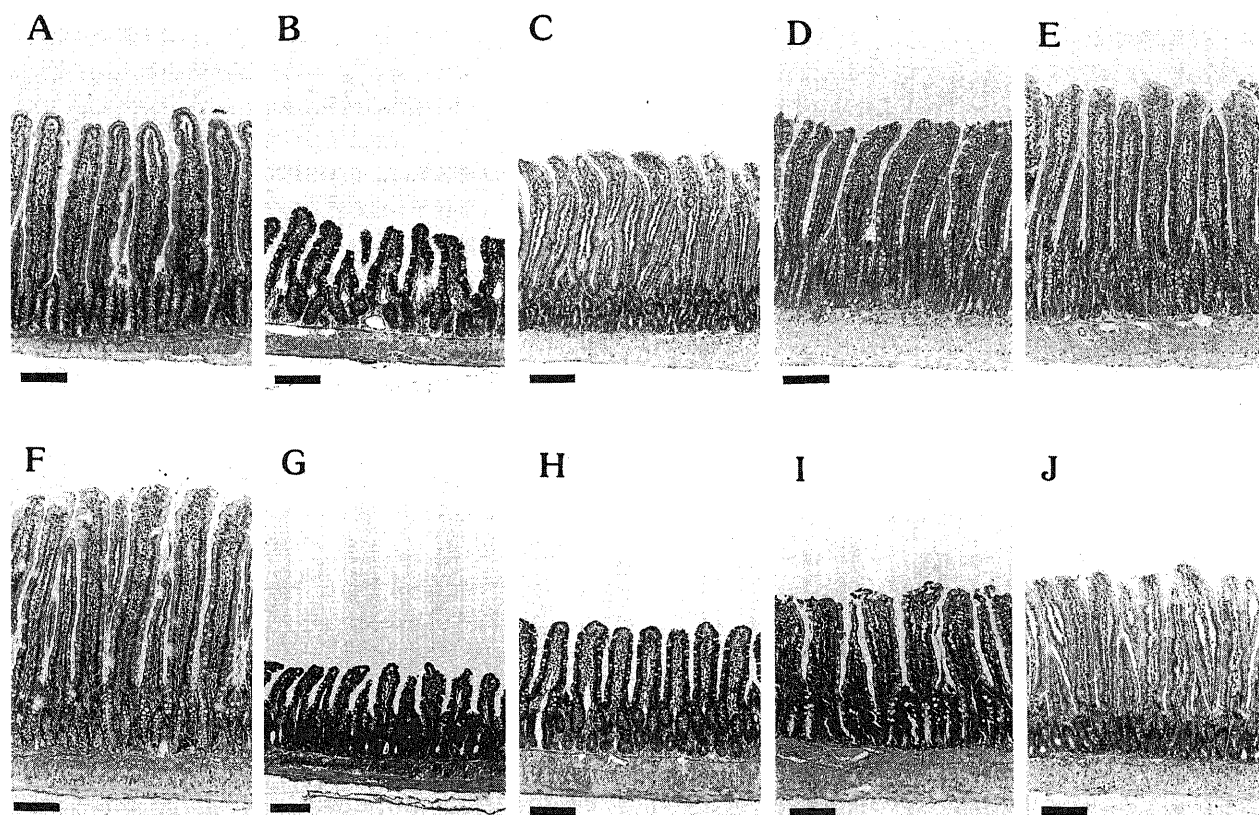


Fig. 1. Histological changes of the small intestinal mucosa caused by fasting and refeeding. (A) non-fasting young rats. (B) young rats 3 days after fasting. (C) young rats 24 hr after refeeding. (D) young rats 48 hr after refeeding. (E) young rats 72 hr after refeeding. (F) non-fasting adult rats. (G) adult rats 3 days after fasting. (H) adult rats 24 hr after refeeding. (I) adult rats 48 hr after refeeding. (J) adult rats 72 hr after refeeding. HE stainings, bar: 100 μ m in each figures.

るため正常ヤギ血清 (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) に15分間反応させた後、100倍希釈抗c-Fosモノクローナル抗体 (Oncogene Research Products, Cambridge, USA), 100倍希釈抗c-Junモノクローナル抗体 (Oncogene Research Products), 50倍希釈抗PCNAモノクローナル抗体 (Oncogene Research Products) と一晩4℃にて反応させた。PBSにて洗浄した後、ビオチン化抗マウスIgG抗体 (Dakopatts) に室温で30分間反応させ、次いでストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (Dakopatts) に15分間反応させ、0.04% 3, 3'-ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine) (Sigma) 溶液で発色させた。核染色は0.3%メチルグリーンにて行った。陰性コントロールには1次抗体として非免疫マウス血清を用い、陽性像が得られないことを確認した。PCNA標識率は、分母を小腸陰窩底のPCNA染色陽性細胞から陰窩最上部のPCNA染色陽性細胞までの間の増殖帯細胞数、分子をPCNA染色陽性細胞数として1腺管における比率で表した。1検体につき10腺管以上観察しその平均値で表した。

V. 組織切片を用いたアポトーシスの検出

免組織化学染色に用いたホルマリン固定パラフィン包埋標本より、4 μ m薄切片を作製し、ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ加ビオチン-デオキシウリジン5'-三リン酸ニック末端標識 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine-5'-triphosphate-biotin nick end-labeling, TUNEL) 法にてアポトーシスの検索を行った。各操作は、Gavrieliら¹⁶⁾と同様の方法にて行った。

VI. 統計学的検討

各数値は、平均値 \pm 標準偏差 ($\bar{x} \pm SD$) をもって表し、平均値の差の有意差検定はF検定により等分散の検定を行った後、Studentのt検定を行い、危険率5%未満を有意とした。

成 績

I. 小腸粘膜上皮の組織学的変化

幼少群、成熟群ともに、絶食後には非絶食群に比較して絨毛の短縮が認められ、絶食解除後、再摂食時間の経過とともに絨

毛の伸長が認められた (図1)。絶食直後の絨毛高は幼少群、成熟群の間に有意な差を認めなかった。しかし、絶食解除後の幼少群の絨毛伸長は迅速で、絶食解除後24, 48, 72時間の絨毛高は成熟群に比較し有意に高値であった。また、絶食解除後、絨毛が伸長し、非絶食群の絨毛高との間に有意差を認めなくなるまでの時間は、幼少群では48時間であったのに対し、成熟群では96時間であった (表1)。

小腸陰窩深は、幼少群では絶食直後に一過性に短縮したあと回復したが、成熟群では絶食直後より絶食解除後24時間まで有意な短縮を認めた (表2)。

II. RT-PCR サザンプロット法によるc-fosとc-junのmRNAの発現

幼少群のc-fos, c-junの発現量は、絶食解除後2時間から72時間まで増加し、非絶食群に比較し有意に高値であった (図2, 3)。c-fosは絶食解除後2時間で非絶食群に比較し最高3.1倍、c-junは絶食解除後24時間で非絶食群に比較し最高2.8倍の高発現を認め、c-fos, c-junともに絶食解除後2時間から72時間まで成熟群に比較し有意に高値であった。成熟群のc-fos, c-junの発現量は、非絶食群に比較し有意な増加を認めなかった。

III. 免疫組織化学染色

c-Fos, c-Jun蛋白の免疫組織化学染色では、幼少群、成熟群ともに非絶食群は、増殖帯に1腺管あたり2~6個の染色陽性細胞を認めた。絶食解除後の幼少群では、c-Fos, c-Jun蛋白ともに、増殖帯と吸収上皮の両方の細胞核が染色された。特に幼少群の絶食解除後24時間、48時間群の増殖帯全体と吸収上皮の下部の細胞核が強く染色されたのに対し、成熟群では増殖帯のみに1腺管あたり1~7個の陽性細胞がみられるにすぎなかった (図4)。(c-Jun蛋白の結果未表示)。

IV. PCNA標識率による細胞動態の解析

幼少群、成熟群ともに非絶食群のPCNA染色細胞は増殖帯の細胞核に散在性に認められ、幼少群と成熟群でPCNA標識率に有意な差を認めなかった。幼少群では、絶食解除後よりPCNA標識率の上昇を認め、絶食解除後2時間で最高値に達し、48時

Table 1. Morphometric analysis of the villous height of small intestine following refeeding periods of the young and adult rats

Refeeding time (hr)	Villous height (μ m)	
	Young	Adult
N	400 \pm 28	473 \pm 21
0	190 \pm 15 **	170 \pm 13 **
2	183 \pm 9 **	203 \pm 11 **
24	314 \pm 8 **	261 \pm 10 **
48	378 \pm 6 *	293 \pm 6 **
72	431 \pm 14 *	375 \pm 17 **
96	443 \pm 11	419 \pm 15
120	444 \pm 15	454 \pm 21

N, non fasting rats. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

* $p < 0.05$ by Student's t test, compared with the adult rats.

** $p < 0.05$ by Student's t test, compared with the non-fasting rats of each group.

Table 2. Morphometric analysis of the crypt depth of small intestine following refeeding periods of the young and adult rats

Refeeding time (hr)	Crypt depth (μ m)	
	Young	Adult
N	120 \pm 14	156 \pm 15
0	97 \pm 17 *	60 \pm 9 **
2	116 \pm 12	97 \pm 13 **
24	110 \pm 23	114 \pm 22 **
48	134 \pm 13	152 \pm 14
72	118 \pm 17	156 \pm 17
96	121 \pm 18	167 \pm 16
120	134 \pm 17	163 \pm 16

N, non fasting rats. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

* $p < 0.05$ by Student's t test, compared with the young non-fasting rats.

** $p < 0.05$ by Student's t test, compared with the adult non-fasting rats.

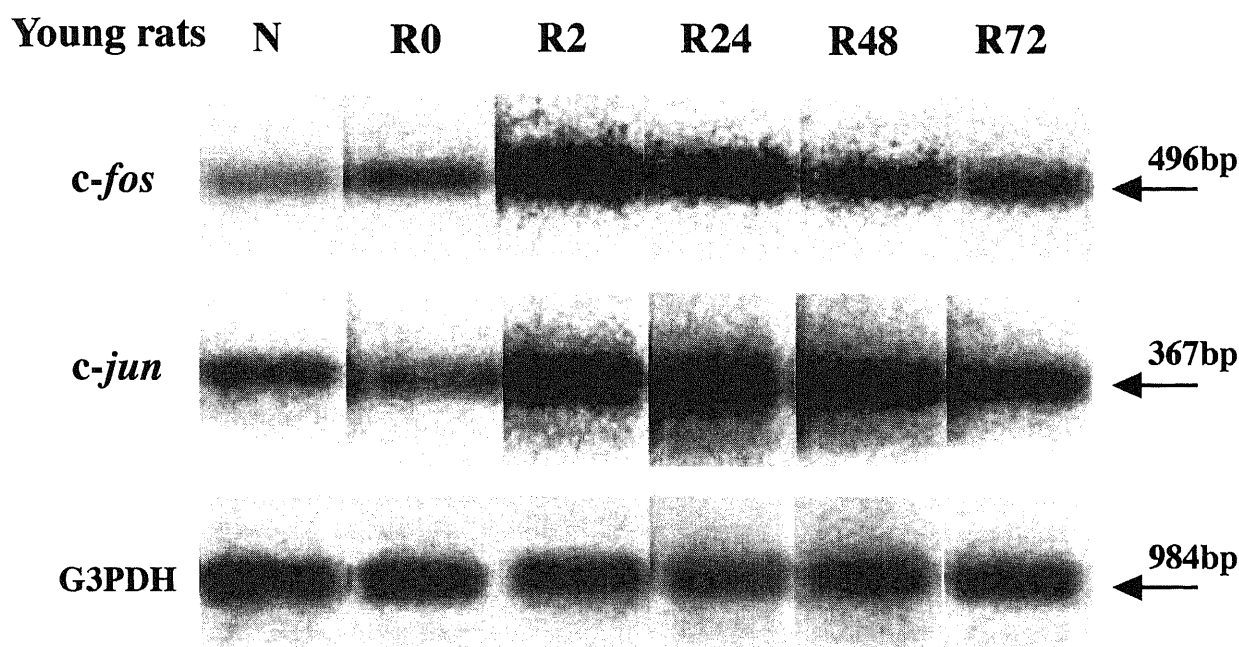


Fig. 2. Southern blot analysis of *c-fos*, *c-jun* and G3PDH mRNA RT-PCR products of the young group. Total RNA (4 μ g) from the rat small intestinal mucosa was reverse transcribed in cDNA and the cDNA was diluted at from $\times 10$ and amplified by 25 cycles of PCR. N, non-fasting rats; R0, 72 hr after fasting; R2, 2 hr after refeeding; R24, 24 hr after refeeding; R48, 48 hr after refeeding; R72, 72 hr after refeeding; base pair.

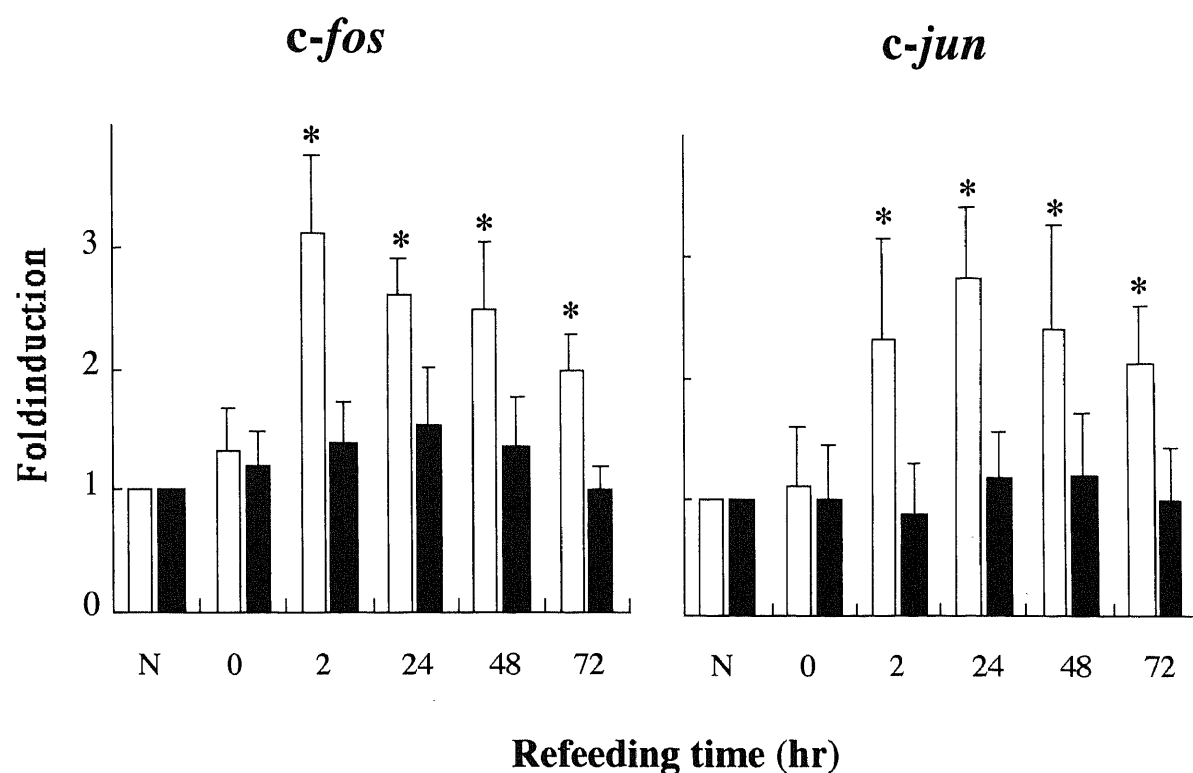


Fig. 3. Southern blot analysis of *c-fos* and *c-jun* mRNA expression in the rat small intestinal mucosa. Data are means of five separate experiments normalized with G3PDH and expressed as the ratio of *c-fos* or *c-jun* to the non-fasting rats. White columns show young rats; Black columns show adult rats; N, non-fasting rats. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$, by Students t test, compared with the adult rats on each refeeding time.

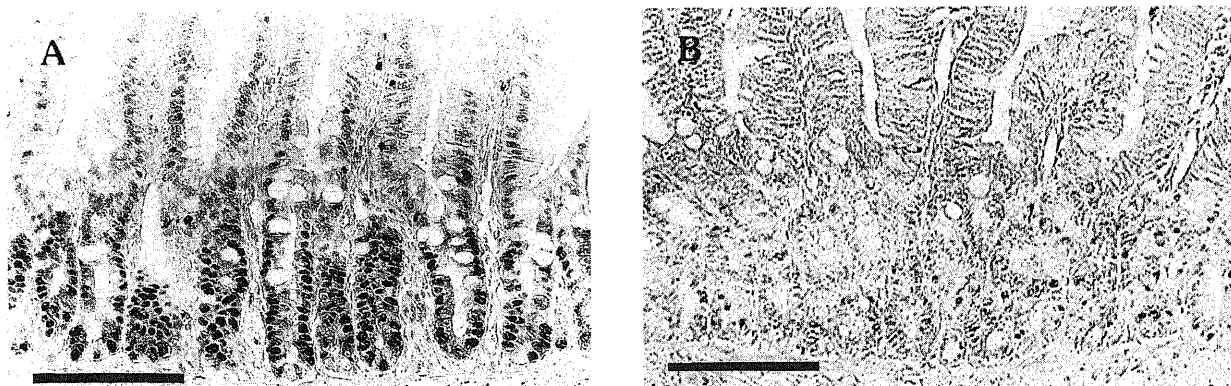


Fig. 4. Immunostaining for c-Fos proteins in the rat small intestine. (A) In the young group 24 hr after refeeding, a marked c-Fos immunoreactivity is observed in the both nuclei of the crypt cells and of the lower part of the absorptive epithelial cells. (B) In the adult group 24 hr after refeeding, c-Fos immunoreactivity is scattered only in the nuclei of the crypt cells. Bar: 100 μ m in each figures.

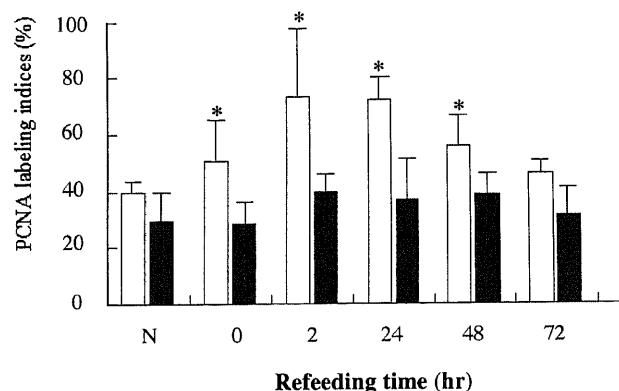


Fig. 5. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling indices following fasting and refeeding periods. PCNA labeling indices are obtained as the percentage of PCNA positive cells to the total number of crypt cells, and calculated from observation of at least 10 crypts in each slice. Every measurement is repeated at least twice and is performed in five rats in each time point. White columns show young rats; Black columns show adult rats; N, non-fasting rats. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$.

* $p < 0.05$ by Students t test, compared with the adult rats on each refeeding time.

間まで非絶食群に比較し有意な高値を維持した。一方、成熟群では、絶食解除後2, 24, 48時間でわずかに上昇したが、有意差はなかった(図5)。

V. 組織切片を用いたアポトーシスの検出

幼少群と成熟群の非絶食群、絶食解除後の各群それぞれの組織切片を用い、TUNEL法によるアポトーシス細胞の検出を行った。幼少群と成熟群ともに、絶食前から絶食解除後の全期にわたり、絨毛の先端にのみ1腺管あたり1~4個の染色陽性細胞を認めた。また、幼少群と成熟群ともに、絶食前から絶食解除後の全期にわたりアポトーシス細胞数の変化を認めなかった。

考 察

生体内の各臓器は外因に対する適応力を有しており、低栄養

や、損傷、ショック時における虚血等の侵襲に対して、その後の増殖や肥大等による代償反応を生じることが知られている。例えば、肝切除後の残存肝では肝細胞の増殖による機能の代償が生じ¹⁷⁾、皮膚損傷後の創縁では上皮細胞の増殖による修復機構が起きる¹⁸⁾。小腸においても、絶食、切除、虚血、虚血後再灌流等の侵襲がおよぶと、粘膜絨毛は障害を受け一旦脱落・短縮するが、その後粘膜絨毛は再生し、消化吸收機能を回復することが知られている^{11~14)}。しかし、これらの代償反応は、高齢者では小児に比較して不十分で^{5)~10)}、その年齢差に関わる機序は充分には解明されていない。小腸広範切除後には、消化吸收面積の減少により高度の栄養障害が出現し、長期にわたる栄養管理は容易ではない。小児では残存小腸の粘膜増殖や小腸内径の増大化等の代償反応により、経静脈栄養から離脱可能な症例もあるが、高齢者の代償能は不十分である⁵⁾。このような小腸機能不全の症例に対し欧米ではすでに小腸移植による治療が始まっており、近い将来日本でも開始されと考えられている^{11)~13)}。移植された小腸粘膜絨毛は術前後の侵襲により短縮し、その後、増殖反応が生じることが知られている^{18)~19)}。移植小腸の絨毛再生は、消化吸收機能の回復とともに、粘膜防御機能の改善にも役立ち生命の維持に重要な反応である。しかし、増殖能は小児と高齢者と同様ではなく、ドナーの年齢により異なる可能性がある²⁰⁾。したがって、術後の移植小腸機能を予測するうえで、加齢に伴う粘膜増殖能の変化を解明することは意義あることと考えられる。

今回の実験では、絶食刺激解除後の小腸粘膜増殖能の加齢による変化を幼少ラットと成熟ラットを用い比較検討した。組織形態学的に、絶食後の小腸絨毛高は、幼少群、成熟群ともに非絶食群に比べ短縮を認めたものの、幼少群と成熟群で差を認めなかった。しかし、絶食解除後の絨毛再生は明らかに幼少群の方が迅速であった。また、幼少群の小腸陰窩深は、絶食直後にのみ一過性の短縮を認めたのに対し、成熟群では絶食直後より絶食解除後24時間まで短縮を認めた。Tsukamotoら²¹⁾は肝部分切除後の肝再生時の蛋白合成に関する実験で、60週齢の成熟ラットに比較して6週齢の幼少ラットの蛋白合成の増加率が高いことを示し、Tannoら²²⁾は8週齢と96週齢のラットを比較した肝再生の実験で、PCNA標識率より幼少ラットの増殖活性の高さを報告した。本研究では肝における再生と同様に、小腸粘

膜の増殖能も成熟群と比較して幼少群が高いことが示された。

小腸粘膜は細胞回転の早い組織であり、自由摂食中の増殖帯幹細胞では常に一定速度の分裂増殖が生じている²⁹⁾。この増殖制御には、EGF, TGF- α , TGF- β , FGF, PDGF等の増殖因子が関与しており、これらの増殖因子の刺激にตอบสนองして、*c-fos* ならびに *c-jun* 遺伝子をはじめとする前初期遺伝子群 (immediate early genes) が発現することが明らかになっている²⁴⁾。小腸以外の臓器では、肝切除後の残存肝²⁵⁾、移植肝²⁶⁾、皮膚損傷後の創縁¹⁸⁾等で、細胞増殖の際に *c-fos*, *c-jun* 遺伝子が発現することが確認されており、小腸粘膜増殖時の同遺伝子の解析は小腸粘膜の増殖機序の解明につながると考えられる。

幼少群と成熟群の増殖能の違いを *c-fos*, *c-jun* の mRNA の発現量から比較検討すると、幼少群では *c-fos* mRNA の発現量は絶食解除後2時間で非絶食群の3.1倍、*c-jun* mRNA の発現量は絶食解除後24時間で2.8倍の増加を示したのに対し、成熟群では絶食解除後の全期を通して *c-fos*, *c-jun* mRNA とともに非絶食群に比較し発現量の有意な増加を認めなかった。また、PCNA 標識率を指標とした細胞増殖活性は、幼少群では絶食解除を契機にして明らかな上昇を示したのに対し、成熟群ではわずかな上昇しか認めなかった。さらに、幼少群の *c-fos* と *c-jun* の mRNA の発現量の増加と、細胞増殖活性の上昇の時間的推移は、絶食解除後2時間から24時間をピークとしたほぼ相似の経過を示したことから、絶食解除を契機に活性化した *c-fos*, *c-jun* が細胞増殖活性の上昇に関与していることが示唆された。この *c-Fos* と *c-Jun* の蛋白の発現部位は、免疫組織化学染色を行った結果、増殖帯と吸収上皮であることが示された。小腸絨毛上皮細胞の増殖は増殖帯で生じているとされるが、*c-Fos* と *c-Jun* の蛋白が吸収上皮にも検出されたことは、*c-fos*, *c-jun* 遺伝子の作用が、増殖帯の幹細胞のみならず消化吸收機能を獲得するまでの細胞分化の過程にも作用している可能性が推察される。なお、絶食解除後24時間と48時間の幼少群小腸粘膜から抽出した蛋白を試料とし Western blott 法による *c-Fos* と *c-Jun* の蛋白の検出を行い、それぞれの分子量を示す単一のパンドとして検出した。このことは、免疫染色にて確認された *c-Fos* と *c-Jun* の蛋白レベルでの発現、ならびに本実験に用いた抗 *c-Fos* と抗 *c-Jun* モノクローナル抗体の特異性を示すものである。

一方、成熟群では、絶食解除後に幼少群と比較し緩慢な絨毛伸長を示したが、*c-fos*, *c-jun* の発現量の増加を認めず、増殖活性は非絶食群と比較し、わずかな上昇しか認めなかった。すなわち、成熟群では絶食、絶食解除に関わらず、増殖活性は、ほぼ一定であることが示された。自由摂食中の小腸粘膜絨毛では、種々の増殖因子によって増殖が制御され、常に一定速度の細胞回転が生じていることが知られている²⁴⁾。しかし長期の絶食後や粘膜損傷時等の侵襲時には、生体からは迅速な粘膜再生が要求され、早急な組織再生を惹起する目的で *c-fos*, *c-jun* の発現量が増加し、一段と増殖活性が高まることが推察される。本実験において、幼少群ではこの反応が生じ、迅速な絨毛の再生が惹起されたのに対し、成熟群ではこの反応が欠如したために、絨毛伸長は幼少群と比較して緩慢であったと推論できる。すなわち、早急な組織再生が必要な侵襲時に、迅速な増殖を惹起する目的で *c-fos*, *c-jun* の発現量が増加するか否かが、幼少群と成熟群の増殖活性の相違点であり、加齢による増殖能の変化の一因であると考えられる。Seshadri ら²⁷⁾ は、繊維芽細胞を用いた実験で、加齢により *c-fos*, *c-jun* の活性が低下することを報告し、

Riabowol ら²⁸⁾ は、細胞の加齢により *c-fos*, *c-jun*, AP-1 の活性が低下することを明らかにしている。これらの報告は、著者の推論を裏付けるものである。

ところで、*c-fos*, *c-jun* 遺伝子が小腸粘膜増殖に関連しているとする報告の一方で、これらの遺伝子が血液細胞や神経細胞等のアポトーシスにも関連があるとする報告が散見される^{29)~32)}。しかし、幼少群と成熟群の組織切片で、TUNEL法を用いてアポトーシス細胞の検出を行った結果、幼少群と成熟群ともに、絨毛の先端にのみ染色陽性細胞を認めたが、絶食前から絶食解除後の全期にわたり陽性細胞数の変化を認めなかった。また、絶食解除後の粘膜絨毛増殖に関して、*c-Fos* と *c-Jun* の蛋白の発現部位が増殖帯幹細胞であったこと、*c-fos*, *c-jun* 遺伝子の発現量増加が、PCNA 標識率が高値の時期に認められたことより、今回の実験において *c-fos*, *c-jun* 遺伝子は、粘膜上皮細胞のアポトーシスよりむしろ粘膜増殖に関連していると考えられた。

本研究では、哺乳期の終了した生後5週齢のラットを幼少モデルとし、生存率が下がり始める生後60週齢のラットを成熟モデルとして実験に供した。今回用いた60週齢のラットは、ラットの平均生存をヒトのそれと対応させると壮年期に相当し、加齢モデルの選択として高齢とは言えない。しかし、ヒトでの高齢に相当する100週齢のラットを実験に用いるまでの飼育効率が極めて悪いことを考慮し、実験には本週齢のラットを選択した。結果的には、幼少群と成熟群の間に、増殖能と、*c-fos*, *c-jun* 遺伝子の活性化に差を認めたので、この週齢選択は妥当であったと考えられる。しかし、さらに高齢のラットの増殖能はどう変化するのか、どれくらいの週齢から *c-fos*, *c-jun* 遺伝子の活性化が減弱し、増殖能が低下し始めるのか等を検討するため、さらに週齢の異なったラットを用いた実験が必要である。また、本研究では飲水のみで飢餓状態に耐えられる最長期間として、絶食期間を72時間に設定した。粘膜増殖を観察する際には、粘膜絨毛を充分短縮させる必要があり、絶食期間は可能な限り長期に設定するのが望ましい。しかし、96時間以上の絶食刺激により成熟ラットに少なからぬ衰弱死亡例が認められたので、本研究では絶食期間を72時間に設定した。この結果、幼少群、成熟群ともに絶食刺激による死亡例を認めず、かつ絶食後の粘膜絨毛高の充分な短縮を認め、絶食解除後の粘膜増殖が観察可能であった。また、今回の研究では、絶食解除の際に *c-fos*, *c-jun* の活性化を誘導した具体的な刺激物質、刺激伝達経路は明らかではない。加齢による *c-fos*, *c-jun* の活性化の減弱する機序、*c-fos*, *c-jun* を制御する物質の解明が進めば、侵襲時に認められる粘膜絨毛の再生促進の治療に応用可能であり、ひいては消化吸收能と粘膜防御機能の改善にもつながると考えられる。

本研究では、*c-fos* と *c-jun* の活性化が、小腸粘膜絨毛の増殖活性に関与していること、加齢による *c-fos* と *c-jun* の活性化の欠如が、増殖能の低下に関連していることを明らかにした。

c-fos と *c-jun* の発現量は小腸粘膜の増殖能を反映し、その測定は移植腸管のその後の吸収機能を知る指標として有用であり臨床応用が期待される。

結 論

小腸粘膜上皮細胞の加齢に伴う増殖能の変化に関する機序を解明するため、幼少ならびに成熟ラットの腸における絶食解除後の組織形態、*c-fos*, *c-jun* の mRNA と蛋白の発現、PCNA を

用いた細胞増殖活性の時間的推移を検討し、以下の知見を得た。

1. 絶食解除後の粘膜増殖は成熟群に比較して幼少群の方が迅速で、絨毛再生に要する時間は幼少群では48時間であったのに対し、成熟群では96時間であった。

2. *c-fos* と *c-jun* の mRNA の発現量は、幼少群では絶食解除後2時間から増加し、非絶食群に比較し絶食解除後2時間で *c-fos* は3.1倍、絶食解除後24時間で *c-jun* は2.8倍であった。成熟群では、絶食解除後に *c-fos* と *c-jun* の mRNA 発現量の有意な増加を認めなかった。

3. c-Fos と c-Jun 蛋白の発現部位は、増殖帯と吸収上皮であった。

4. PCNA 標識率でみた粘膜増殖活性は、幼少群では絶食解除後上昇し、絶食解除後2時間を最高に、絶食解除後48時間まで成熟群に比較して高い増殖活性を認めた。成熟群では絶食解除後72時間まで増殖活性の上昇を認めなかった。

以上より、転写因子 *c-fos* と *c-jun* の活性化が、小腸粘膜絨毛の増殖活性に関与していること、また、加齢による *c-fos* と *c-jun* の活性化の欠如が増殖能の低下に関連していることが明らかにされた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師三輪晃一教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり、終始直接御指導、御鞭撻を賜りました八木雅夫博士ならびに橋本哲夫博士に心から感謝致します。また、御助言と御協力を頂きました金沢大学医学部外科学第二講座の皆様にも感謝致します。

本研究の一部は、科学研究費補助金10671168の援助を受けた。

尚、本研究の要旨は第52回日本消化器外科学会(1998, 東京)、第34回日本移植学会(1998, 東京)において発表した。

文 献

- 1) Hodin RA, Graham JR, Meng S, Upton MP. Temporal pattern of rat small intestinal gene expression with refeeding. *Am J Physiol* 266: 83-89, 1994
- 2) Ehrenfried JA, Townsend CM, Thompson JC, Evers BM. Increases in *nup* 475 and *c-jun* are early molecular events that precede the adaptive hyperplastic response after small bowel resection. *Ann Surg* 222: 51-56, 1995
- 3) 金井陸行, 山岡義生. 消化管の再生: 腸管上皮における創傷治癒. *再生医学* 13: 37-41, 1998
- 4) Taylor RG, Beveridge DJ, Fuller PJ. Expression of ileal glucagon and peptide tyrosine-tyrosine genes. Response to inhibition of polyamine synthesis in the presence of massive small-bowel resection. *Biochem J* 286: 737-741, 1992
- 5) 駿河敬次郎, 平井慶徳, 宮野 武, 中村紘一郎. 新生児小腸広範切除について. *外科治療* 31: 289-296, 1974
- 6) Yoshinaga K, Ishizuka J. Age-related changes in duodenal adaptation after distal small bowel resection in rat. *Dig Dis Sci* 38: 410-416, 1993
- 7) Holt PR, Kotler DP. Adaptive changes of intestinal enzymes to nutritional intake in aging rat. *Gastroenterology* 93: 295-300, 1987
- 8) Raul F, Gosse F, Doffoel M, Darmenton P, Wessely JY. Age related increase of brush border enzyme activities along the small intestine. *Gut* 29: 1557-1563, 1988

- 9) Sakamoto K, Fujiyama Y, Bamba T. Altered polyamine biosynthesis with aging after massive proximal small bowel resection in rat. *J Gastroenterol* 31: 338-346, 1996
- 10) Poston GJ, Saydjari R, Lawrence J, Alexander RW, Townsend CM, Thompson JC. The effect of age on small bowel adaptation and growth after proximal enterectomy. *J Gerontol* 45: 220-225, 1990
- 11) Furukawa H, Reyes J, Abu-Elmagd K, Miele L, Hutson W, Kocoshis S, Tabasco-Manguillan J, Lee RG, Knisley A, Todo S. Intestinal transplantation at the University of Pittsburgh: six-year experience. *Transplant Proc* 29: 688-689, 1997
- 12) Rayes J, Todo S, Bueno J, Furukawa H, Abu-Elmagd K, Elmagd K, Green M, Kocoshis S, Kasper S, Yunis K, Starzl TE. Intestinal transplantation in children: five-year experience. *Transplant Proc* 28: 2755-2756, 1996
- 13) Rayes J, Tzakis AG, Todo S, Nour B, Casavila A, Abu-Elmagd K, Fung J, Starzl TE. Nutritional management of intestinal transplant recipients. *Transplant Proc* 25: 1200-1201, 1993
- 14) Abu-Elmagd K, Tzakis A, Todo S, Rayes J, Fung J, Nakamura J, Wright H, Furukawa H, Demetris J, Starzl TE. Monitoring and treatment of intestinal allograft rejection in humans. *Transplant Proc* 25: 1202-1203, 1993
- 15) Angel P, Karin M. The role of JUN, FOS and AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072: 129-157, 1991
- 16) Gavie Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 17) Kropacova K, Misurova E. Influence of age and gamma irradiation on the proliferating activity in regenerating rat liver. *Physiol Res* 41: 135-140, 1992
- 18) Grant D, Hurburt D, Zhong R, Wang P, Chen H, Garcia B, Beheme R, Stiller C, Duff J. Intestinal permeability and bacterial translocation following small bowel transplantation in the rat. *Transplantation* 52: 221-224, 1991
- 19) Lee RG, Nakamura K, Tsmandas AC, Abu-Elmagd K, Furukawa H, Hutson WR, Reyes J, Tabasco-Minguillan S, Todo S, Demetris AJ. Pathology of human intestinal transplantation. *Gastroenterology* 110: 1820-1834, 1996
- 20) Martin P, Nobes CD. An early molecular component of the wound healing response in rat embryos; induction of *c-fos* protein in cells at the epidermal wound margin. *Mech Dev* 38: 209-216, 1992
- 21) Tsukamoto I, Nakata R, Koji S. Effect of aging on rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Mol Biol Int* 30: 773-778, 1993
- 22) Tanno M, Ogiwara M, Taguchi T. Age-related changes in proliferating cell nuclear antigen levels. *Mech Ageing Dev* 229: 53-66, 1992
- 23) 黒坂慶幸. 小腸の発癌抵抗性に関する実験的研究. *十全医会誌* 26: 2793-2803, 1993
- 24) Beauchamp RD, Sheng HM, Shao JY, Thompson EA, Tien C. Intestinal cell cycle regulation. *Ann Surg* 223: 620-628, 1996

- 25) Morello D, Lavenu A, Babinet C. Differential regulation and expression of *jun*, *c-fos*, and *c-myc* proto-oncogenes during mouse liver regeneration and after inhibition of protein syntheses. *Oncogene* 5: 1511-1519, 1990
- 26) Hrusovsky S, Jouvenot M, Vuillermoz C, Heyd B, Chabod P, Manton G, Miguët JP, Adessi GL. Regeneration of transplanted human liver: gene expression at the time of graft implantation. *CR Seances Soc Biol Fil* 188: 245-258, 1994
- 27) Seshadri T, Campisi J. Repression of *c-fos* transcription and altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 247: 205-208, 1990
- 28) Riabowol K, Schiff J, Gilman MZ. Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 157-161, 1992
- 29) Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia / reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 42: 530-537, 1998
- 30) 胡麗那, 徳久剛史. *c-fos* 過剰発現による幼若B細胞でのアポトーシス誘導. *日本臨床* 54: 1876-1880, 1996
- 31) Guegan C, Levy V, David JP, Ajchenbaum-Cymbalista F, Sola B. *c-jun* and cyclin D1 protein as mediators of neuronal death after a focal ischaemic insult. *Neuroreport* 8: 1003-1007, 1997
- 32) Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF. Expression of *c-fos* and *c-jun* during hepatocellular remodeling following ischemia / reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 23: 1546-1555, 1996

Age-related Changes in the Expression of the Immediate Early Gene, *c-fos* and *c-jun* in the Regenerating Small Intestines of Rats. Hideaki Nezuka, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Jusen Med Soc.*, **108**, 157 — 165 (1999)

Key words *c-fos*, *c-jun*, refeeding, aging, growth of the small intestinal epithelium

Abstract

This study was performed to determine the effect of aging on growth of the small intestinal epithelium following fasting and refeeding, and to investigate the mechanism of regeneration of villi. Two groups of male Lewis rats (young; 5-weeks-old, n=30, adult; 60-weeks-old, n=30) were fasted for 3 days and then refed a chow diet for up to 3 days. The mucosae were examined to determine the expression levels of any *c-fos* and *c-jun* protein and mRNA, and their growth ability was estimated by immunochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The mucosae revealed marked atrophy after fasting and regeneration followed during the refeeding period. The villous heights of the young group recovered to the non-fasting state within 48 hr after refeeding, while the adult group required at least 96 hr for the recovery. In the young group, the expression of *c-fos* mRNA was found to have increased to 3.1 times its normal non-fasting state at 2 hr after refeeding, and *c-jun* mRNA to have increased to 2.8 times at 24 hr after refeeding, while in the adult group neither changed significantly following the refeeding period. PCNA expression in the young group was significantly elevated between 2 and 48 hr after refeeding, reaching its highest level at 2 hr after refeeding, while in the adult group it was not significantly elevated until 72 hr after refeeding. These results suggest that the expression of *c-fos* and *c-jun* in the small intestinal epithelium of young rats following refeeding correlates with cellular regeneration, and that the lack of activation of these genes in the adult group contributes to the resulting slow regeneration.